



IN THE UNITED STATES PATENT AND TRADEMARK OFFICE

In re Application of: Gunji et al.	
	Art Unit: 1652
Application No.: 10/716,470	Examiner: [to be assigned]
Filing Date: November 20, 2003	Atty. Docket: US-103
Title: Method for producing L-lysine or L-arginine by using methanol-assimilating bacterium	

CLAIM FOR PRIORITY UNDER 35 U.S.C. § 119 IN UTILITY APPLICATION

Commissioner of Patents
P.O. Box 1450
Alexandria, VA 22313-1450


Sir:

Priority under 35 U.S.C. § 119 is hereby claimed to the following priority document(s), filed in a foreign country within one (1) year prior to the filing of the above-referenced United States utility patent application (35 U.S.C. § 172):

Country	Priority Document Appl. No.	Filing Date
Japan	2002-336340	November 20, 2002

A certified copy of each listed priority document is submitted herewith. Prompt acknowledgment of this claim and submission is respectfully requested.

Respectfully submitted,


Shelly Guest Cermak
Reg. No. 39,571

Date: April 2, 2004
PTO Customer Number: **000038108**
Ajinomoto Corporate Services, LLC
1120 Connecticut Avenue, Ste. 1010
Washington, D.C. 20036
202.457.0284

日本国特許庁
JAPAN PATENT OFFICE

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出願年月日 2002年11月20日
Date of Application:

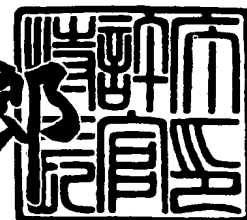
出願番号 特願2002-336340
Application Number:
[ST. 10/C]: [JP 2002-336340]

出願人 味の素株式会社
Applicant(s):

2003年 7月10日

特許庁長官
Commissioner,
Japan Patent Office

太田信一郎



【書類名】 特許願

【整理番号】 P-B0246

【提出日】 平成14年11月20日

【あて先】 特許庁長官殿

【国際特許分類】 C12N 15/00
C12P 13/06

【発明の名称】 メタノール資化性菌を用いたL-リジンまたはL-アルギニンの製造法

【請求項の数】 9

【発明者】

【住所又は居所】 神奈川県川崎市川崎区鈴木町 1 - 1 味の素株式会社内

【氏名】 郡司 義哉

【発明者】

【住所又は居所】 神奈川県川崎市川崎区鈴木町 1 - 1 味の素株式会社内

【氏名】 安枝 寿

【特許出願人】

【識別番号】 000000066

【氏名又は名称】 味の素株式会社

【代理人】

【識別番号】 100089244

【弁理士】

【氏名又は名称】 遠山 勉

【選任した代理人】

【識別番号】 100090516

【弁理士】

【氏名又は名称】 松倉 秀実

【選任した代理人】

【識別番号】 100100549

【弁理士】

【氏名又は名称】 川口 嘉之

【連絡先】 0 3 - 3 6 6 9 - 6 5 7 1

【手数料の表示】

【予納台帳番号】 012092

【納付金額】 21,000円

【提出物件の目録】

【物件名】 明細書 1

【物件名】 図面 1

【物件名】 要約書 1

【プルーフの要否】 要

【書類名】 明細書

【発明の名称】 メタノール資化性菌を用いたL-リジンまたはL-アルギニンの製造法

【特許請求の範囲】

【請求項1】 ループ領域と、6個の疎水性ヘリックスとを有し、かつ、L-リジンの細胞外への排出に関与するタンパク質の改変体をコードするDNAであって、野生型タンパク質が持つループ領域を持たない変異型タンパク質をコードし、かつ、メタノール資化性菌に導入したときにL-リジンもしくはL-アルギニン又はこれらの両方のL-アミノ酸の細胞外への排出を促進するDNAが、発現可能な形態で導入され、かつ、L-リジンもしくはL-アルギニン生産能を有するメチロバチラス属細菌。

【請求項2】 前記変異タンパク質が実質的に疎水性ヘリックスのみからなる請求項1記載のメチロバチラス属細菌。

【請求項3】 前記変異タンパク質が6個の疎水性ヘリックスのすべてを有する請求項1又は2に記載のメチロバチラス属細菌。

【請求項4】 前記変異タンパク質がN末端から1番目～3番目の疎水性ヘリックスを含むペプチドと、4番目～6番目の疎水性ヘリックスを含むペプチドとの複合体である請求項1～3のいずれか一項に記載のメチロバチラス属細菌。

【請求項5】 前記タンパク質がLysEタンパク質である請求項1～4のいずれか一項に記載のメチロバチラス属細菌。

【請求項6】 前記LysEタンパク質がコリネ型細菌のLysEタンパク質である請求項5記載のメチロバチラス属細菌。

【請求項7】 以下のタンパク質をコードするDNAが、発現可能な形態で導入され、かつ、L-リジン又はL-アルギニン生産能を有するメチロバチラス属細菌。

(A) 配列番号10に記載のアミノ酸配列を有するタンパク質。

(B) 配列番号10に記載のアミノ酸配列において、1若しくは数個のアミノ酸の置換、欠失、挿入又は付加を含むアミノ酸配列からなり、かつ、メタノール資化性菌においてL-リジンもしくはL-アルギニン又はこれらの両方のアミノ酸

の細胞外への排出を促進する活性を有するタンパク質。

【請求項 8】 請求項 1～7 のいずれか一項に記載のメチロバチラス属細菌を培地に培養し、該培養物中に L-リジン又は L-アルギニンを生産蓄積させ、該培養物から L-リジン又は L-アルギニンを採取することを特徴とする L-リジン又は L-アルギニンの製造法。

【請求項 9】 前記培地がメタノールを主たる炭素源とすることを特徴とする請求項 8 記載の L-リジン又は L-アルギニンの製造法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】

本発明は微生物工業に関連したものであり、詳しくは、発酵法による L-リジン又は L-アルギニンの製造法、および同製造法に用いる微生物に関するものである。

【0002】

【従来の技術】

L-リジン、L-グルタミン酸、L-スレオニン、L-ロイシン、L-イロソイシン、L-バリン及び L-フェニルアラニン等の L-アミノ酸は、ブレヴィバクテリウム属、コリネバクテリウム属、バチルス属、エシェリヒア属、ストレプトミセス属、シュードモナス属、アースロバクター属、セラチア属、ペニシリウム属、キャンディダ属等に属する微生物を用いた発酵法により工業生産されている。これらの微生物は、生産性を向上させるために、自然界から分離した菌株または該菌株の人工変異株が用いられている。また、組換え DNA 技術により L-アミノ酸の生合成酵素を増強することによって、L-アミノ酸の生産能を増加させる種々の技術が開示されている。

【0003】

上記のような微生物育種や製造法の改良により、L-アミノ酸の生産性はかなり高まってはいるが、今後の需要のいっそうの拡大に応えるためには、さらに安価かつ効率的な L-アミノ酸の製造法の開発が求められている。

【0004】

ところで、従来、安価に大量に入手可能な発酵原料であるメタノールから発酵法により L-アミノ酸を製造する方法としては、アクロモバクター属およびシュードモナス属（特許文献 1）、プロタミノバクター属（特許文献 2）、プロタミノバクター属及びメタノモナス属（特許文献 3）、ミクロサイクラス属（特許文献 4）、メチロバチルス属（特許文献 5）、バチルス属（特許文献 6）などに属する微生物を用いる方法が知られている。本発明者らはこれまで、人工変異による育種および組換え DNA 技術を使って、メチロフィラス属細菌を用いた L-アミノ酸製造法の開発を行ってきた（特許文献 7）。

【0005】

近年、L-アミノ酸を特異的に微生物の菌体の外部に排出する機能を持つタンパク質および遺伝子が同定され、特に Vrljic らは、コリネバクテリウム属細菌から L-リジンの菌体外への排出に関与する遺伝子を同定した（非特許文献 1）。この遺伝子は *lysE* と名付けられ、同遺伝子をコリネバクテリウム属細菌において増強させることによって、コリネバクテリウム属細菌の L-リジン生産能が向上することが報告されている（特許文献 8）。また、*lysE* は L-リジンだけでなく L-アルギニンも排出することが示されている（非特許文献 2）。また、エシェリヒア・コリにおいてアミノ酸排出タンパク質の発現量を上昇させることにより、いくつかの L-アミノ酸の生産性を向上させることができることが知られている（特許文献 9）。例えば、エシェリヒア・コリにおいては、ORF306 遺伝子の発現を増強することによって、シスチン、システイン等の生産性が向上することが報告されている（特許文献 10）。

しかし、これまでメタノール資化性菌を用いたメタノールからの発酵法によるアミノ酸製造に、アミノ酸の排出過程が、大きな障壁であることを示した例はない。また、メタノール資化細菌で、排出活性を発揮できる、アミノ酸排出遺伝子についての報告はない。

【0006】

【特許文献 1】

特開昭45-25273号公報

【特許文献 2】

特公昭49-125590号公報

【特許文献 3】

特開昭50-25790号公報

【特許文献 4】

特開昭52-18886号公報

【特許文献 5】

特開平4-91793号公報

【特許文献 6】

特開平3-505284号公報

【特許文献 7】

国際公開パンフレット第00/61723号

【特許文献 8】

国際公開パンフレット第97/23597号

【特許文献 9】

特開平2000-189180号

【特許文献 1 0】

欧州特許公開第885962号公報

【非特許文献 1】

Vrljic M., Sahm H., Eggeling L. Molecular Microbiology 22:815-826(1996)

【非特許文献 2】

Bellmann A., Vrljic M., Patek M., Sahm H., Kramer R., Eggeling L. Microbiology 147:1765-1774(2001)

【0 0 0 7】

【発明が解決しようとする課題】

本発明は、安価に大量に入手可能なメタノールを用いて、効率良く、L-リジン又はL-アルギニンを製造する方法を提供することを課題とする。

【0 0 0 8】

【課題を解決するための手段】

本発明者らは、上記課題を解決するために鋭意検討を重ねた結果、メタノール

資化性菌、とりわけメチロバチラス属細菌を利用してL-アミノ酸を製造する場合、L-アミノ酸の菌体外への排出過程が一つの障壁であること、そして、この障壁を打破する因子として、特にこの微生物にてアミノ酸の排出活性を発揮する遺伝子を取得することに成功し、これを利用することで効率の良いアミノ酸生産ができることを見いだした。

【0009】

本発明者らは、既に知られているコリネバクテリウム属細菌由来のlysE遺伝子を、メタノール資化性菌に導入し、そのアミノ酸生産に及ぼす効果を調べたが、導入したlysE遺伝子には変異や欠損が生じ、lysEを機能させることはできなかった。排出を司るようなタンパク質は、細胞膜に組み込まれてその機能を発揮するため、タンパク質と膜の脂質組成などの状態とが両方で適切なものである必要がある。したがって、異種の生物に由来する膜タンパク質を、その機能を発揮する形で発現させることは困難であると考えられ、上述した結果は、それを裏付けるものであった。

【0010】

本発明者らは、上記のL-アミノ酸の排出遺伝子に関する研究の過程において、偶然にもメタノール資化性菌において機能し得る変異遺伝子を取得した。また、同変異遺伝子を利用することで、メタノール資化性菌を用いたアミノ酸製造において、顕著な効果を見出した。

【0011】

本発明は、上記のようにして完成するに至ったものであり、その要旨は以下のとおりである。

【0012】

(1) ループ領域と、6個の疎水性ヘリックスとを有し、かつ、L-リジンの細胞外への排出に関与するタンパク質の改変体をコードするDNAであって、野生型タンパク質が持つループ領域を持たない変異型タンパク質をコードし、かつ、メタノール資化性菌に導入したときにL-リジンもしくはL-アルギニン又はこれらの両方のL-アミノ酸の細胞外への排出を促進するDNAが、発現可能な形態で導入され、かつ、L-リジンもしくはL-アルギニン生産能を有するメチロ

バチラス属細菌。

(2) 前記変異タンパク質が実質的に疎水性ヘリックスのみからなる (1) 記載のメチロバチラス属細菌

(3) 前記変異タンパク質が6個の疎水性ヘリックスのすべてを有する (1) 又は (2) に記載のメチロバチラス属細菌

(4) 前記変異タンパク質がN末端から1番目～3番目の疎水性ヘリックスを含むペプチドと、4番目～6番目の疎水性ヘリックスを含むペプチドとの複合体である (1) ～ (3) のいずれか一項に記載のメチロバチラス属細菌

(5) 前記タンパク質がLysEタンパク質である (1) ～ (4) のいずれか一項に記載のメチロバチラス属細菌

(6) 前記LysEタンパク質がコリネ型細菌のLysEタンパク質である (5) 記載のメチロバチラス属細菌

(7) 以下のタンパク質をコードするDNAが、発現可能な形態で導入され、かつ、L-リジン又はL-アルギニン生産能を有するメチロバチラス属細菌

(A) 配列番号10に記載のアミノ酸配列を有するタンパク質。

(B) 配列番号10に記載のアミノ酸配列において、1若しくは数個のアミノ酸の置換、欠失、挿入又は付加を含むアミノ酸配列からなり、かつ、メタノール資化性菌においてL-リジンもしくはL-アルギニン又はこれらの両方のアミノ酸の細胞外への排出を促進する活性を有するタンパク質。

(8) (1) ～ (7) のいずれかに記載のメチロバチラス属細菌を培地に培養し、該培養物中にL-リジン又はL-アルギニンを生産蓄積させ、該培養物からL-リジン又はL-アルギニンを採取することを特徴とするL-リジンまたはL-アルギニンの製造法。

(9) 前記培地がメタノールを主たる炭素源とすることを特徴とする (8) 記載のL-リジン又はL-アルギニンの製造法。

【0013】

本発明において、「L-リジンもしくはL-アルギニン又はこれらの両方のL-アミノ酸の細胞外への排出を促進する」とは、本発明のDNAを保持しないメタノール資化性菌に比べて、本発明のDNAを保持するメタノール資化生菌を培

養したときに培地中に排出されるL-リジンもしくはL-アルギニン又はこれらの両方のL-アミノ酸の量を増大させることをいう。L-アミノ酸の細胞外への排出の促進は、その結果として、本発明のDNAを保持しないメタノール資化性菌に比べて、本発明のDNAを保持するメタノール資化生菌を培養したときに培地中に蓄積するL-アミノ酸濃度が高くなることによって観察される。また、L-アミノ酸の細胞外への排出の促進は、本発明のDNAをメタノール資化性菌に導入したときに、細胞内のL-アミノ酸濃度が低下することによっても観察され得る。

【0014】

【発明の実施の形態】

以下、本発明を詳細に説明する。

【0015】

<1>本発明のDNA

本発明のDNAは、メタノール資化性菌に導入したときにL-リジンもしくはL-アルギニン又はこれらの両方のL-アミノ酸の細胞外への排出を促進するDNAであり、微生物のL-リジンの細胞外への排出に関与するタンパク質の改変体をコードするDNAである。

【0016】

本発明のメチロバチラス属細菌とは、メチロバチラス属に属し、メタノールを主たる炭素源として生育することができる細菌であって、本発明のDNAを導入することによってL-リジン又はL-アルギニン等のL-アミノ酸の細胞外への排出が促進される細菌である。具体的には、メチロバチラス・グリコゲネス (*Methylobacillus glyco genes*)、メチロバチラス・フラゲラタム (*Methylobacillus flagellatum*)等が挙げられる。メチロバチラス・グリコゲネスとしては、T-11株 (NCIMB 11375)、ATCC 21276株、ATCC 21371株、ATR80株 (Appl. Microbiol. Biotechnol., (1994)、42巻、p67-72に記載)、A513株 (Appl. Microbiol. Biotechnol., (1994)、42巻、p67-72に記載)等が挙げられる。メチロバチラス・グリコゲネスNCIMB 11375株は、ナショナル・コレクション・オブ・インダストリアル・アンド・マリン・バクテリア (National Collections of Industrial a

nd Marine Bacteria、住所 NCIMB Ltd., Torry Research Station 135, Abbey Road, Aberdeen AB9 8DG, United Kingdom) から入手可能である。また、メチロバチラス・フラゲラタムとしては、KT株(Arch. Microbiol., (1988), 149巻、p441-446に記載)等が挙げられる。

【0017】

本発明のメチロバチラス属細菌は、ループ領域と、6個の疎水性ヘリックスとを有し、かつ、L-リジンの細胞外への排出に関与するタンパク質をコードするDNAに変異を導入し、前記タンパク質がループ領域を持たないように、あるいは実質的に疎水性ヘリックスのみからなるように改変されたDNAを導入することによって、取得することができる。「実質的に疎水性ヘリックスのみからなる」とは、変異型LysEがループ領域を完全に欠失しているか、あるいは一部を有していても、変異型LysEの機能に影響しない程度にループ領域のほとんどを欠失していることをいう。

【0018】

本発明のメチロバチラス属細菌の一形態は、後記実施例に示すlysE24と名付けられたDNAが導入されたメチロバチラス属細菌である。lysE24は、コリネバクテリウム属細菌で報告されているlysE遺伝子のホモログとして、ブレヴィバクテリウム・ラクトファーマンタムから単離された遺伝子の変異体である。したがって、本発明のメチロバチラス属細菌に導入されたDNAを、便宜的に「変異型lysE」と称することがある。

【0019】

lysE遺伝子がコードするLysEタンパク質は、6個の疎水性ヘリックス領域を有している。それらの疎水性ヘリックス領域のいくつかは膜貫通領域であると推定される。また、N末端から3番目と4番目の疎水性ヘリックス領域の間の領域は親水性であり、ループ構造をとると推定される。この親水性領域を本願発明においてはループ領域と呼ぶ。ブレヴィバクテリウム・ラクトファーマンタムの野生型lysEの塩基配列及びLysEタンパク質のアミノ酸配列を、配列番号7及び8に示す。同アミノ酸配列において、疎水性ヘリックス領域は、5～20、37～58、67～93、146～168、181～203、211～232に相当する。ま

た、ループ領域は94～145に相当する。

【0020】

本発明者らは、lysE遺伝子はメタノール資化性菌においては致死的に働くが、ループ領域を持たない、あるいは実質的に疎水性ヘリックスのみからなるLysEタンパク質の改変体をコードするDNAは、メタノール資化性菌のL-リジン及び／又はL-アルギニンの細胞外への排出を促進することを見い出した。本発明のDNAは、このような野生型LysEタンパク質が持つループ領域を持たない変異型LysEタンパク質、又は実質的に疎水性ヘリックスのみからなる変異型LysEタンパク質をコードする。

【0021】

上記のような変異型lysEとしては、少なくとも一つ又は二つ以上の疎水性ヘリックスを有し、メタノール資化性菌に導入したときにL-リジンもしくはL-アルギニン又はこれらの両方のL-アミノ酸の細胞外への排出を促進するものであれば特に制限されないが、具体的にはN末端から1番目～6番目の疎水性ヘリックスのすべてを有する変異型LysEをコードするDNAが挙げられる。より具体的には、N末端から1番目～3番目の疎水性ヘリックスを含むペプチドと、4番目～6番目の疎水性ヘリックスを含むペプチドとをコードするDNAが挙げられる。前記lysE24は、このような1番目～3番目の疎水性ヘリックスを含むペプチドと、4番目～6番目の疎水性ヘリックスを含むペプチドとをコードする変異型lysEの一例である。lysE24遺伝子には、3番目の疎水性ヘリックスをコードする領域の下流に終止コドンが変異により導入されているが、後期実施例に示すように、この終止コドンよりも下流の領域を欠失させると、lysE24遺伝子を導入したメチロバチラス・グリコゲネスNCIMB 11375株はL-リジンを培地中に蓄積しなかった。このことから、1番目～3番目の疎水性ヘリックスを含むペプチドと、4番目～6番目の疎水性ヘリックスを含むペプチドがそれぞれ別個に翻訳され、メチロバチラス・グリコゲネス株中で機能しているものと推定される。いずれにしても、lysE24遺伝子をメチロバチラス属細菌に導入すれば、L-リジン又はL-アルギニンの生産量が向上する。

【0022】

前記のようなL-リジンの細胞外への排出に関与するタンパク質をコードするDNA、すなわちlysE遺伝子またはその相同遺伝子の供与微生物としては、それらの遺伝子の改変体がメタノール資化性菌中でL-リジン排出活性を発現することができるものを保持する微生物であれば、いかなる微生物でも利用できる。具体的には、コリネバクテリウム・グルタミカム、ブレヴィバクテリウム・ラクトファーマンタム等のコリネ型細菌、エシェリヒア・コリ等のエシェリヒア属細菌、シュードモナス・アエルジノーサ等のシュードモナス属細菌、マイコバクテリウム・ツベルクロシス等のマイコバクテリウム属細菌等が挙げられる。

【0023】

メチロバチラス属細菌においてアミノ酸の排出遺伝子を増強する場合は、その遺伝子断片を、メチロバチラスで機能するベクター、好ましくはマルチコピー型ベクターと連結して、組換えDNAを作製し、これをメチロバチラス属細菌の宿主に導入して形質転換すればよい。あるいは、トランスポゾンに搭載し、染色体への組み込みにより、また、メチロバチラス属細菌内で強力転写を誘導するようなプロモーターを、その遺伝子の上流に連結させることも可能である。

【0024】

lysEを開示している文献(WO 97/23597)には、コリネ型細菌のlysE遺伝子をコリネ型細菌に導入した場合のみを提示している。そして、LysEを含む新しい排出系のタンパク質の構造体として、膜横断ヘリックスが6個のものを開示している。しかし、本発明者らは、メタノール資化性細菌においては、コリネ型細菌に由来するようなLysEは全く機能しないことを確認した。更に、取得できた因子は、膜横断ヘリックス6個を1本のポリペプチドで構成しているコリネ型細菌の野生型LysEとは基本的な構造が異なる、新しい型の排出活性を発揮する因子であり、この因子は、先のlysE特許明細書からは全く類推できるものではない。

【0025】

<2>本発明のメチロバチラス属細菌

本発明のメチロバチラス属細菌は、前記本発明のDNAが発現可能な形態で導入され、かつ、L-リジン又はL-アルギニン生産能を有するメチロバチラス属細菌である。L-リジン又はL-アルギニン生産能を有するメチロバチラス属細菌

菌に本発明のDNAを導入することによって得られる。また、本発明のDNAが導入されたメチロバチラス属細菌に、L-リジン又はL-アルギニン生産能を付与することによっても、本発明のメチロバチラス属細菌を得ることができる。また、本発明のメチロバチラス属細菌は、本発明のDNAが発現可能な形態で導入されたことによってL-リジン又はL-アルギニン生産能が付与されたものであってもよい。

【0026】

L-リジン又はL-アルギニン生産能を有するメチロバチラス属細菌は、メチロバチラス属細菌の野生株にL-リジン又はL-アルギニン生産能を付与することにより取得され得る。L-リジン又はL-アルギニン生産能を付与するには、栄養要求性変異株、アナログ耐性株、又は代謝制御変異株の取得、L-リジン又はL-アルギニンの生合成系酵素が増強された組換え株の創製等、従来、コリネ型細菌又はエシェリヒア属細菌等の育種に採用されてきた方法を適用することができる（アミノ酸発酵、（株）学会出版センター、1986年5月30日初版発行、第77～100頁参照）。L-リジン又はL-アルギニン生産菌の育種において、付与される栄養要求性、アナログ耐性、代謝制御変異等の性質は、単独でもよく、2種又は3種以上であってもよい。また、増強されるL-アミノ酸生合成系酵素も、単独であっても、2種又は3種以上であってもよい。さらに、栄養要求性、アナログ耐性、代謝制御変異等の性質の付与と、生合成系酵素の増強が組み合わせられてもよい。

【0027】

例えば、L-リジン生産菌は、L-ホモセリン、又はL-スレオニン及びL-メチオニンを要求する変異株（特公昭48-28078号、特公昭56-6499号）、イノシトールまたは酢酸を要求する変異株（特開昭55-9784号、特開昭56-8692号）、又はオキサリジン、リジンヒドロキサメート、S-（2-アミノエチル）-システイン、 γ -メチルリジン、 α -クロロカプロラクタム、DL- α -アミノ- ϵ -カプロラクタム、 α -アミノ-ラウリルラクタム、アスパラギン酸-アナログ、スルファ剤、キノイド、又はN-ラウロイルロイシンに耐性を有する変異株として育種することができる。

【0028】

また、L-アルギニン生産菌は、サルファ剤、2-チアゾールアラニン又は α -アミノ- β -ヒドロキシ吉草酸等の薬剤に耐性を有する変異株；2-チアゾールアラニン耐性に加えて、L-ヒスチジン、L-プロリン、L-スレオニン、L-イソロイシン、L-メチオニンまたはL-トリプトファン要求性を有する変異株（特開昭54-44096号）；ケトマロン酸、フルオロマロン酸又はモノフルオロ酢酸に耐性を有する変異株（特開昭57-18989号）；アルギニノールに耐性を有する変異株（特開昭62-24075号）；X-グアニジン（Xは脂肪酸又は脂肪鎖の誘導体）に耐性を有する変異株（特開平2-186995号）、5-アザウラシル、6-アザウラシル、2-チオウラシル、5-フルオロウラシル、5-ブロモウラシル、5-アザシトシン、6-アザシトシン等に耐性な変異株、アルギニンヒドロキサメート、2-チオウラシルに耐性な変異株、アルギニンヒドロキサメート及び6-アザウラシルに耐性な変異株（特開昭57-150381号参照）、ヒスチジンアナログ又はトリプトファンアナログに耐性な変異株（特開昭52-114092号参照）、メチニオン、ヒスチジン、スレオニン、プロリン、イソロイシニン、リジン、アデニン、グアニンまたはウラシル（またはウラシル前駆体）の少なくとも一つに要求性を有する変異株（特開昭52-99289号参照）、アルギニンヒドロキサメートに耐性な変異株（特公昭51-6754号参照）、コハク酸要求性又は核酸塩基アナログに耐性な変異株（特開昭58-9692号）、アルギニン分解能を欠損し、アルギニンのアンタゴニスト及びカナバニンに耐性を有し、リジンを要求する変異株（特開昭52-8729号参照）、アルギニン、アルギニンヒドロキサメート、ホモアルギニン、D-アルギニン、カナバニン耐性、アルギニンヒドロキサメート及び6-アザウラシル耐性の変異株（特開昭53-143288号参照）、及び、カナバニン耐性の変異株（特開昭53-3586号参照）として育種することができる。

【0029】

次に、L-アミノ酸生合成系酵素遺伝子の増強によってL-アミノ酸生産能を付与又は増強する方法を、以下に例示する。

【0030】

L-リジン生産能は、例えば、ジヒドロジピコリン酸合成酵素活性及びアスパルトキナーゼ活性を増強することによって付与することができる。

メチロバチラス属細菌のジヒドロジピコリン酸合成酵素活性及びアスパルトキナーゼ活性を増強するには、ジヒドロジピコリン酸合成酵素をコードする遺伝子断片及びアスパルトキナーゼをコードする遺伝子断片を、メチロバチラス属細菌で機能するベクター、好ましくはマルチコピー型ベクターと連結して組み換えDNAを作製し、これをメチロバチラス属細菌の宿主に導入して形質転換すればよい。形質転換株の細胞内のジヒドロジピコリン酸合成酵素をコードする遺伝子及びアスパルトキナーゼをコードする遺伝子のコピー数が上昇する結果、これらの酵素の活性が増強される。以下、ジヒドロジピコリン酸合成酵素をDDPS、アスパルトキナーゼをAK、アスパルトキナーゼIIIをAKIIIと略すことがある。

【0031】

DDPSをコードする遺伝子及びAKをコードする遺伝子の供与微生物としては、メチロバチラス属に属する微生物中でDDPS活性及びAK活性を発現することができる微生物であれば、いかなる微生物でも使用できる。微生物は、野生株及びそれから誘導した変異株のいずれでもよい。具体的にはE. coli (エシェリヒア・コリ (Escherichia coli)) K-12株及びメチロバチラス・グリコゲネスNCIMB 11375株等が挙げられる。エシェリヒア属細菌由来のDDPSをコードする遺伝子 (dapA, Richaud, F. et al. J. Bacteriol., 297(1986)) 及びAKIIIをコードする遺伝子 (lysC, Cassan, M., Parsot, C., Cohen, G.N. and Patte, J.C., J. Biol. Chem., 261, 1052(1986)) は、いずれも塩基配列が明らかにされているので、これらの遺伝子の塩基配列に基づいてプライマーを合成し、E. coli K-12等の微生物の染色体DNAを鋳型とするPCR法により、これらの遺伝子を取得することが可能である。以下、E. coli由来のdapA及びlysCを例として説明するが、本発明に用いる遺伝子は、これらに限定されるものではない。

【0032】

本発明に用いるDDPS及びAKは、L-リジンによるフィードバック阻害を受けないものであることが好ましい。E. coli由来の野生型DDPSはL-リジンによるフィードバック阻害を受けることが知られており、E. coli由来の野生型AKIIIはL

ーリジンによる抑制及びフィードバック阻害を受けることが知られている。したがって、メチロバチラス属細菌に導入するdapA及びlysCは、それぞれLーリジンによるフィードバック阻害が解除される変異を有するDDPS及びAKIIIをコードするものであることが好ましい。以下、Lーリジンによるフィードバック阻害が解除される変異を有するDDPSを「変異型DDPS」、変異型DDPSをコードするDNAを「変異型dapA、又はdapA*」と呼ぶことがある。また、Lーリジンによるフィードバック阻害が解除される変異を有するE. coli由来のAKIIIを「変異型AKIII」、変異型AKIIIをコードするDNAを「変異型lysC」と呼ぶことがある。

【0033】

尚、本発明においては、DDPS及びAKは必ずしも変異型である必要はない。例えば、コリネバクテリウム属細菌由来のDDPSはもともとLーリジンによるフィードバック阻害を受けないことが知られている。

【0034】

E. coli由来の野生型dapAの塩基配列を配列番号13に、同塩基配列によってコードされる野生型DDPSのアミノ酸配列を配列番号14に例示する。

【0035】

Lーリジンによるフィードバック阻害を受けない変異型DDPSをコードするDNAとしては、118位のヒスチジン残基がチロシン残基に置換された配列を有するDDPSをコードするDNAが挙げられる。また、Lーリジンによるフィードバック阻害を受けない変異型AKIIIをコードするDNAとしては、352位のスレオニン残基がイソロイシン残基に置換された配列を有するAKIIIをコードするDNAが挙げられる。

【0036】

遺伝子のクローニングに使用されるプラスミドとしては、エシェリア属細菌等の微生物において複製可能なものであればよく、具体的には、pBR322、pTWV228、pMW119、pUC19等が挙げられる。

【0037】

また、メチロバチラス属細菌で機能するベクターとは、例えばメチロバチラス属細菌で自律複製出来るプラスミドである。具体的には、広宿主域ベクターであ

るRSF1010及びその誘導体、例えばpAYC32 (Chistorerdov, A.Y., Tsygankov, Y. D. Plasmid, 1986, 16, 161-167)、あるいはpMFY42 (gene, 44, 53(1990))、p RP301、pTB70 (Nature, 287, 396, (1980)) 等が挙げられる。

【 0 0 3 8 】

dapA及びlysCとメチロバチラス属細菌で機能するベクターを連結して組み換え DNA を調製するには、dapA及びlysCを含むDNA断片の末端に合うような制限酵素でベクターを切断する。連結は、T4 DNAリガーゼ等のリガーゼを用いて行うのが普通である。dapA及びlysCは、それぞれ別個のベクターに搭載してもよく、同一のベクターに搭載してもよい。

【 0 0 3 9 】

変異型DDPSをコードする変異型dapA及び変異型AKIIIをコードする変異型lysCを含むプラスミドとして、広宿主域プラスミドRSFD80が知られている (W095/160 42号)。同プラスミドで形質転換されたE. coli JM109株は、AJ12396と命名され、同株は1993年10月28日に通産省工業技術院生命工学工業技術研究所 (現 独立行政法人 産業技術総合研究所 特許生物寄託センター) に受託番号FERM P-13936として寄託され、1994年11月1日にブダペスト条約に基づく国際寄託に移管され、FERM BP-4859の受託番号のもとで寄託されている。RSFD80は、AJ12396株から、公知の方法によって取得することができる。

【 0 0 4 0 】

上記のように調製した組換えDNAをメチロバチラス属細菌に導入するには、十分な形質転換効率が得られる方法ならば、いかなる方法を用いてもよいが、例えば、エレクトロポレーション法 (Canadian Journal of Microbiology, 43. 19 7(1997)) が挙げられる。

【 0 0 4 1 】

DDPS活性及びAK活性の増強は、dapA及びlysCをメチロバチラス属細菌の染色体DNA上に多コピー存在させることによって達成できる。メチロバチラス属細菌の染色体DNA上にdapA及びlysCを多コピーで導入するには、染色体DNA上に多コピー存在する配列を標的に利用して相同組換えにより行う。染色体DNA上に多コピー存在する配列としては、レペッティティブDNA、転移因子の端部

に存在するインバーティッド・リピートが利用できる。あるいは、特開平2-109985号公報に開示されているように、dapA及び／又はlysCをトランスポゾンに搭載してこれを転移させて染色体DNA上に多コピー導入することも可能である。いずれの方法によっても形質転換株内のdapA及lysCのコピー数が上昇する結果、DDPS活性及びAK活性が増幅される。

【0042】

DDPS活性及びAK活性の増幅は、上記の遺伝子増幅による以外に、dapA及lysCのプロモーター等の発現調節配列を強力なものに置換することによっても達成される（特開平1-215280号公報参照）。たとえば、lacプロモーター、trpプロモーター、trcプロモーター、tacプロモーター、ラムダファージのPRプロモーター、PLプロモーター、tetプロモーター、amyEプロモーター、spacプロモーター等が強力なプロモーターとして知られている。これらのプロモーターへの置換により、dapA及lysCの発現が強化されることによってDDPS活性及びAK活性が増幅される。発現調節配列の増強は、dapA及lysCのコピー数を高めることと組み合わせてもよい。

【0043】

遺伝子断片とベクターを連結して組換えDNAを調製するには、遺伝子断片の末端に合うような制限酵素でベクターを切断する。連結は、T4DNAリガーゼ等のリガーゼを用いて行うのが普通である。DNAの切断、連結、その他、染色体DNAの調製、PCR、プラスミドDNAの調製、形質転換、プライマーとして用いるオリゴヌクレオチドの設定等の方法は、当業者によく知られている通常の方法を採用することができる。これらの方法は、Sambrook, J., Fritsch, E. F., and Maniatis, T., "Molecular Cloning A Laboratory Manual, Second Edition", Cold Spring Harbor Laboratory Press, (1989)等に記載されている。

【0044】

DDPS及びAKの増強に加えて、他のL-リジン生合成に関与する酵素を増強してもよい。そのような酵素としては、ジヒドロジピコリン酸レダクターゼ、ジアミノピメリン酸脱炭酸酵素、ジアミノピメリン酸デヒドロゲナーゼ（以上、W096/40934号参照）、ホスホエノールピルビン酸カルボキシラーゼ（特開昭60-87788号

)、アスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ(特公平6-102028号)、ジアミノピメリン酸エピメラーゼ遺伝子、アスパラギン酸セミアルデヒド脱水素酵素等のジアミノピメリン酸経路の酵素、あるいはホモアコニット酸ヒドラターゼ遺伝子等のアミノアジピン酸経路の酵素等が挙げられる。

【0045】

また、メタノール資化性菌としてメチロフィラス・メチロトロファス由来のアスパルトキナーゼ、アスパラギン酸セミアルデヒド脱水素酵素、ジヒドロジピコリン酸合成酵素、ジヒドロジピコリン酸レダクターゼ、及び、ジアミノピメリン酸脱炭酸酵素は、W0 00/61723に開示されている。

【0046】

さらに、本発明の微生物は、L-リジンの生合成経路から分岐してL-リジン以外の化合物を生成する反応を触媒する酵素の活性が低下または欠損していてもよい。L-リジンの生合成経路から分岐してL-リジン以外の化合物を生成する反応を触媒する酵素としては、ホモセリンデヒドロゲナーゼがある(WO 95/23864参照)。

【0047】

上記のL-リジン生合成に関与する酵素の活性を増強する手法は、L-アルギニンについても同様に適用することができる。

L-アルギニンは、例えば、アセチルオルニチンデアセチラーゼ活性、N-アセチルグルタミン酸- γ -セミアルデヒドデヒドロゲナーゼ活性、N-アセチルグルタモキナーゼ活性、及びアルギニノサクシナーゼ活性を増強することによって付与することができる(特公平5-23750号)。

【0048】

また、グルタミン酸デヒドロゲナーゼ(EP 1 057 893 A1)、アルギニノコハク酸シンターゼ(EP 0 999 267 A1)、カルバモイルリン酸シンセターゼ(EP 1 026 247 A1)、もしくはN-アセチルグルタミン酸シンターゼ(特開昭57-5693号参照)の活性を増強すること、又は、アルギニンリプレッサーをコードする遺伝子(argR)を破壊することによって、L-アルギニン生産能を向上させることができる。

【0049】**<3> L-リジン又はL-アルギニンの製造**

上記のようにして得られるL-リジン又はL-アルギニン生産能を有するメチロバチラス属細菌を培地に培養し、該培養物中にL-リジン又はL-アルギニンを生産蓄積させ、該培養物からL-リジン又はL-アルギニンを採取することにより、L-リジン又はL-アルギニンを製造することができる。

【0050】

本発明で用いられる微生物は、通常メタノール資化性微生物の培養に用いられる方法で培養することができる。本発明で用いられる培地は、炭素源、窒素源、無機イオン及び必要に応じてその他の有機微量成分を含む培地であれば、天然培地、合成培地のいずれでも用いられる。

【0051】

メタノールを主たる炭素源として用いると、L-リジン又はL-アルギニンを安価に製造することができる。メタノールは、主たる炭素源として用いる場合は、培地中に0.001~30%添加する。窒素源としては硫酸アンモニウムなどを培地に添加して用いる。これらの他に、通常、リン酸カリウム、リン酸ナトリウム、硫酸マグネシウム、硫酸第一鉄、硫酸マンガンなどの微量成分が少量添加される。

【0052】

培養は、振とう培養又は通気攪拌培養などの好気条件下、pH5~9、温度20~45℃に保持して行われ、通常24~120時間で終了する。

培養物からのL-リジン又はL-アルギニンの採取は、通常イオン交換樹脂法、沈殿法、その他の公知の方法を組み合わせることにより実施できる。

【0053】**【実施例】**

以下、本発明を実施例によりさらに具体的に説明する。

試薬は、特記しない限り和光純薬、又はナカライテスク社製のものをを用いた。各実施例で用いる培地の組成は以下に示すとおりである。いずれの培地もpHはNaOHまたはHClで調整した。

【0054】

(LB培地)

バクト・トリプトン (ディフコ社製) 10g/L

酵母エキス (ディフコ社製) 5g/L

NaCl 10g/L

pH7.0

[120℃、20分間蒸気滅菌を行った。]

【0055】

(LB寒天培地)

LB培地

バクトアガー 15g/L

[120℃、20分間蒸気滅菌を行った。]

【0056】

(SEII培地) (Journal of general microbiology(1989) 125, 135, 3153-3164

Silman N. J., Carver M. A. & Jones C. W. 参照。但し、若干の改変を加えた

。)

K₂HPO₄ 1.9g/L

NaH₂PO₄ 1.56g/L

MgSO₄·7H₂O 0.2g/L

(NH₄)₂SO₄ 5g/L

CuSO₄·5H₂O 5 μg/L

MnSO₄·5H₂O 25 μg/L

ZnSO₄·7H₂O 23 μg/L

CaCl₂·2H₂O 72mg/L

FeCl₃·6H₂O 9.7mg/L

CaCO₃ (関東化学製) 30g/L

メタノール 2% (vol/vol)

pH7.0

[メタノール以外は121℃、15分間蒸気滅菌を行った。良くさめてからメタノールを添加した。]

【0057】

(SEII寒天培地)

K_2HPO_4	1.9g/L
NaH_2PO_4	1.56g/L
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	0.2g/L
$(NH_4)_2SO_4$	5g/L
$CuSO_4 \cdot 5H_2O$	5 μ g/L
$MnSO_4 \cdot 5H_2O$	25 μ g/L
$ZnSO_4 \cdot 7H_2O$	23 μ g/L
$CaCl_2 \cdot 2H_2O$	72mg/L
$FeCl_3 \cdot 6H_2O$	9.7mg/L
メタノール	0.5% (vol/vol)

pH7.0

バクトアガー(デフコ社製) 15g/L

[メタノール以外は121℃、15分間蒸気滅菌を行った。良くさめてからメタノールを添加した。]

【0058】

【実施例1】

<1>ブレヴィバクテリウム属細菌由来のlysE遺伝子のメチロフィラス属細菌への導入

【0059】

コリネバクテリウム属細菌で知られているL-リジンの排出を促進する遺伝子の相同遺伝子であるlysE遺伝子をブレヴィバクテリウム属細菌よりクローニングし、メチロフィラス属細菌での発現を試みた。

【0060】

(1) pRSlysEの構築

メチロフィラス属細菌にlysEを導入するために、公知のプラスミドpRS (特表平3-501682号公報参照) を用いて、lysE発現用プラスミドpRSlysEを構築した。pRSは、RSF1010の誘導体である広宿主域ベクタープラスミドpAYC32 (Chistorerdo

v, A.Y., Tsygankov, Y.D. Plasmid, 1986, 16, 161-167) に由来するpVIC40プラスミド (W090/04636国際公開パンフレット、特表平3-501682号公報) より、同プラスミドが持つスレオニンオペロンをコードするDNA領域を削除してベクター部分のみを持つプラスミドである。

【0061】

まず、pRSより、tacプロモーターを持つプラスミドpRStacを図1に示す方法で構築した。pRStacプラスミドは、pRSベクターを制限酵素EcoRIおよびPstIで消化し、フェノール・クロロホルム溶液を加えて混合し、反応を停止させた。反応液を遠心分離した後、上層を回収し、エタノール沈殿にてDNAを回収後、0.8%アガロースゲルにて分離し、約8キロベースペア (以下、「kbp」と記載) のDNA断片をEASY TRAP Ver.2 (DNA回収キット、宝酒造社製) を用いて回収した。一方、tacプロモーター領域を、pKK223-3プラスミド (発現用ベクター、Pharmacia社製) を鋳型とし、配列番号1および2に示すプライマーを用いて、PCRにより増幅した (変性94℃-20秒、アニーリング55℃-30秒、伸長反応72℃-60秒のサイクルを30サイクル行った)。PCR反応にはPyrobest DNA polymerase (宝酒造社製) を使用した。増幅されたtacプロモーターを含むDNA断片をPCRprep (Promega社製) にて精製した後、あらかじめプライマー中にデザインしておいた制限酵素サイト、すなわちEcoRIおよびEcoT22Iで消化し、フェノール・クロロホルム溶液を加えて混合し、反応を停止させた。反応液を遠心分離した後、上層を回収し、エタノール沈殿にてDNAを回収した後、0.8%アガロースゲルにて分離し、約0.15kbpのDNA断片をEASY TRAP Ver.2を用いて回収した。

【0062】

上記のように調製したpRSベクター消化物と、tacプロモーター領域断片を、DNA Ligation Kit Ver.2 (宝酒造製) を用いて連結させた。この連結反応溶液でエシェリヒア・コリ (E.coli JM109 competent cells、宝酒造製) を形質転換し、20mg/Lのストレプトマイシンを含むLB寒天培地に塗布し、37℃で一晩保温した。寒天培地上に出現したコロニーを20mg/Lのストレプトマイシンを含むLB液体培地に接種し、37℃で8時間振盪培養した。アルカリ-SDS法にて各培養液からプラスミドDNAを抽出し、制限酵素で消化して構造を確認し、pRStacを得た。pRSベクタ

一上のストレプトマイシン耐性遺伝子の転写方向とtacプロモーターの転写方向が同じ向きになっているものを、pRStacとして選択した。

【0063】

上記のようにして得たpRStacを、Sse8387I（宝酒造製）およびSapI（ニューイングランドバイオラボ社製）で消化し、フェノール・クロロホルム溶液を加えて混合し、反応を停止させた。反応液を遠心分離した後、上層を回収し、エタノール沈殿にてDNAを回収後、0.8%アガロースゲルで分離し、約9.0kbpのDAN断片を回収した。

【0064】

また、ブレヴィバクテリウム・ラクトファーマンタム 2 2 5 6 株（ATCC13869）より抽出した染色体を鋳型として、配列番号 5 および 6 に示すプライマーを用いたPCR法（変性94℃-20秒、アニーリング55℃-30秒、伸長反応72℃-90秒）によりlysE遺伝子断片を増幅した。PCR反応には、Pyrobest DNA polymerase（宝酒造社製）を使用した。このとき、lysE遺伝子がメチロフィラス属細菌中で発現可能となるように、lysE遺伝子の翻訳開始コドンより9~15bp塩基を、メチロフィラス属細菌で機能することがわかっている配列（Wyborn, N. R., Mills, J., Williams, S. G. and Jones, C.W., Eur.J.Biochem., 240, 314-322(1996)）に変更するようにプライマーをデザインした。得られた断片をPCRprep（Promega社製）にて精製した後、制限酵素Sse8387IおよびSapIで消化した。フェノール・クロロホルム溶液を加えて混合し、反応を停止させた。反応液を遠心分離した後、上層を回収し、エタノール沈殿にてDNAを回収し、0.8%アガロースゲルで回収した。

【0065】

上記のように調製したpRStacベクター消化物と、lysE遺伝子領域断片を、DNA Ligation Kit Ver.2（宝酒造製）を用いて連結させた。この連結反応溶液でエシエリヒア・コリ（E.coli JM109 competent cells、宝酒造製）を形質転換し、20 mg/Lのストレプトマイシンを含むLB寒天培地に塗布し、37℃で一晩保温した。寒天培地上に出現したコロニーを20mg/Lのストレプトマイシンを含むLB液体培地に接種し、37℃で8時間振盪培養した。アルカリーSDS法にて各培養液からプラスミドDNAを抽出し、制限酵素での消化および塩基配列の決定により構造を確認して

、pRSlysEを得た（図1）。pRSlysEは、tacプロモーターの転写方向に対して、lysE遺伝子の転写方向が同じ向きになるように配置されている。

【0066】

（2）メチロフィラス属細菌へのpRSlysEの導入

上記のようにして得られたpRSlysEを、エレクトロポレーション法（Canadian Journal of Microbiology, 43. 197 (1997)）によりメチロフィラス・メチロトロファスAS1株（NCIMB10515）に導入した。なお、対照として、pRSをpRSlysEと同様にしてAS1株に導入した。その結果、対照として用いたpRSでは1 μ gのDNAあたり数千個のコロニーを得たが、それに対してpRSlysEでは数個のコロニーしか得られなかった。

【0067】

pRSlysEが導入されたと思われる形質転換株よりプラスミドを抽出して塩基配列を調べたところ、調べたすべてのプラスミドにおいて、lysEをコードする領域内に自然変異が導入され、それらの変異のうちいくつかは、アミノ酸をコードするコドンが翻訳を停止させる停止コドンに置き換わるナンセンス変異が導入されていた。また、別のプラスミドではlysE遺伝子に欠失がみられた。これらのプラスミドに搭載されているlysEは、いずれも、機能が失われていることが考えられた。また、このlysE遺伝子の機能を失わせるような形でlysEをコードする領域の一部を意図的に欠失させたプラスミド（pRSlysE Δ 1）を作製し、メチロフィラス・メチロトロファスに導入を試みたところ、対照として用いたpRSベクターと同等の頻度で導入できた。

前記pRSlysE Δ 1は、lysEをコードする領域内に存在するPvuI（配列番号7の203-209位のCGATCGを認識）からMluI（同485-491位のACGCGT）までの領域を欠失させたプラスミドであり、以下のようにして構築した。具体的には、pRSlysEをPvuIおよびMluI（宝酒造製）にて消化し、フェノール・クロロホルム溶液を加えて、混合し反応を停止させた。反応液を遠心分離した後、上層を回収し、エタノール沈殿にてDNAを回収後、0.8%アガロースゲルで分離し、約10kbpのDNA断片を回収した。このDNA断片をDNA Blunting Kit（宝酒造製）にて末端を平滑化した。これをDNA ligation kit Ver2（宝酒造製）にて自己連結（セフルファイグレーション）

させた。

上記の連結反応溶液でエシェリヒア・コリ (E.coli JM109 competent cells、宝酒造社製) を形質転換し、20mg/L のストレプトマイシンを含む LB 寒天培地に塗布し、37℃ で一晩保温した。寒天培地上に出現したコロニーを 20mg/L のストレプトマイシンを含む LB 液体培地に接種し、37℃ で 8 時間振盪培養した。アルカリ-SDS 法にて各培養液からプラスミド DNA を抽出し、制限酵素での消化により構造を確認して、pRSlysE Δ 1 プラスミドを得た。

【0068】

以上のように、全長の lysE 遺伝子を搭載する pRSlysE のメチロフィラス・メチロトロファスへの導入頻度は極めて低く、また機能を失わせるような変異が導入された lysE 変異遺伝子を持つプラスミドのみが導入できたことと併せて考えると、メチロフィラス・メチロトロファスに lysE 遺伝子を導入することは致死性であると考えられた。このことは、lysE 遺伝子が異種の細菌において L-リジンの排出に関して万能に機能するものではないことを示している。

【0069】

変異が導入された pRSlysE を持つメチロフィラス・メチロトロファス AS1 株を、20mg/L のストレプトマイシンを含む SEII プレートに塗り広げ、37℃ にて 1 晩培養したのち、培地表面約 0.3cm² の菌体をかきとって 20mg/L のストレプトマイシンを含む SEII 生産培地 (20ml) に植菌し、37℃ にて 34 時間振盪培養した。培養終了後、菌体を遠心分離により除去し、培養上清に含まれる L-リジン濃度をアミノ酸分析計 (日本分光製、高速液体クロマトグラフィー) で定量した。その結果、変異型 lysE 遺伝子が導入されても L-リジンの排出が促進されたと思われる株はほとんど得られなかった。

【0070】

<2>メチロフィラス属細菌で L-リジン排出活性を示す遺伝子の取得

前項で述べたように、既知の lysE 遺伝子はメチロフィラス属細菌中では致死性であることが示唆され、機能が失われたような変異型遺伝子が多く得られた。

【0071】

変異が導入された pRSlysE の解析を行ううちに、メチロフィラス属細菌中で機

能する変異型lysE遺伝子を取得することができた。

【0072】

この変異型lysE遺伝子をlysE24遺伝子と命名した。lysE24遺伝子の塩基配列を解析したところ、この変異は、アミノ酸置換が起こる変異ではなく、lysEの翻訳領域内のほぼ中央に終止コドンが導入されるナンセンス変異であることがわかった。コリネバクテリウム属細菌のlysE遺伝子は6個の疎水性ヘリックスを持つ膜タンパク質であることが報告されている (Vrlijc M., Sahm H., Eggeling L. Molecular Microbiology 22:815-826(1996)) が、このlysE24遺伝子は終止コドンが導入されているため、同遺伝子がコードするタンパク質は、野生型lysE遺伝子がコードするLysEタンパク質とは異なる構造を有し、この構造によってメチロフィラス属細菌中で機能することがわかった。

【0073】

lysE24の塩基配列を決定した結果を配列番号9に示す。対照として野生型のlysEの塩基配列を配列番号7に示した。lysE24では、配列番号7の355位のG (グアニン) のあとにT (チミン) が挿入されていた。このlysE24を持つプラスミドをpRSlysE24と命名した (図1)。pRSlysE24をあらためてAS1株に導入したところ、pRSとはほぼ同頻度でプラスミドが導入できた。プラスミド導入株について、<1> (2) と同様の方法で培養上清中のL-リジン濃度を測定した結果を、表1に示す。

【0074】

【表1】

表1

菌株	L-リジンの生産量 (g/L)
AS1/pRS	<0.01
AS1/pRSlysE24	0.1

【0075】

pRSlysE24で形質転換された*E. coli* JM109株はAJ13830と命名され、同株は2001年6月4日に、独立行政法人 産業技術総合研究所 特許生物寄託センターに受託番号FERM P-18369として寄託され、平成14年5月13日にブダペスト条約に基づく国際寄託に移管され、FERM BP-8040の受託番号のもとで寄託されている。

【0076】

尚、lysE24遺伝子から、前記変異により生成した終止コドンよりも下流の領域をさせたプラスミドすなわち、<1> (1) に記載のpRSlysEΔ1プラスミドを導入したAS1株はL-リジンを培地中に蓄積しなかった。このことから、lysE24遺伝子では前半部分のペプチドだけでなく、後半部分のペプチドも発現し、複合体を形成しているものと考えられる。

【0077】

【実施例2】

以上のようにコリネバクテリウム属細菌で知られているL-リジンの排出を促進する遺伝子の相同遺伝子であるlysE遺伝子は、メチロフィラス属細菌中では全く機能しないが、lysE24という改変体はメチロフィラス属細菌で機能することがわかった。そこで、次にメチロバチラス属細菌において、コリネバクテリウム属細菌のlysE遺伝子が機能するかどうか、また実施例1で得られたlysE24が機能するかどうかを調べた。

【0078】

(1) pRSlysE-Tcの構築

メチロバチラス属細菌にコリネバクテリウム属細菌由来の野生型lysEを導入するために、まず実施例1にて構築したpRSlysEの薬剤耐性マーカーを、ストレプトマイシン耐性遺伝子からテトラサイクリン耐性遺伝子へと変更することにした。これは、使用したメチロバチラス属細菌はストレプトマイシンにもともと耐性を示すため、ストレプトマイシン耐性をマーカーとして使用することができないためである。

【0079】

具体的には、まずpRSlysEを制限酵素EcoRIで消化し、フェノール・クロロホルム混合溶液を加えて混合し、消化反応を停止させた。反応液を遠心分離した後、

上層の溶液を回収し、エタノール沈澱法にてDNA断片を回収した。これを0.8%アガロースゲル電気泳動にて分離し、約10 kbpのDNA断片をEASY TRAP ver.2 (DNA回収キット、宝酒造社製)を用いて回収した。

【0080】

一方、テトラサイクリン耐性遺伝子領域は、pRK310 (Journal of Molecular Biology (1994) 239: 623-663に記載) を鋳型DNAとして、配列番号11および12に示すDNAプライマーを用いてPCRにより増幅した(変性工程94℃-20秒、アニーリング工程55℃-30秒、伸長反応工程72℃-60秒の反応サイクルを30サイクル実施した。)。PCR反応には、Pyrobest DNA polymerase(宝酒造社製)を使用した。増幅されたテトラサイクリン耐性遺伝子を含むDNA断片はPCRprep(Promega社製)にて精製後、エタノール沈澱法にて回収した。これを更に、あらかじめプライマー中にデザインしておいた制限酵素サイト、すなわちEcoRIで消化し、フェノール・クロロホルム混合液を加え、反応を停止させた。次に、この反応液を遠心分離し上層を回収し、エタノール沈澱法にてDNAを回収した後、0.8%アガロースゲル電気泳動にて目的DNA断片を分離し、約1.5kbpのDNA断片を回収した。

尚、テトラサイクリン耐性遺伝子は、pRK310に代えて他のプラスミド、例えば、pRK310の親プラスミドであるpRK2プラスミド(NICMBからNICMB11968として入手可能。Science(1975) 190. 1226-1228 または Plasmid(1981) 5. 10-19) を鋳型とし、上記と同様のPCR反応によっても、取得することができる。

【0081】

上記のように調製したpRSlysEに由来するDNA断片と、テトラサイクリン耐性遺伝子領域を含むDNA断片を、DNA Ligation kit ver.2(宝酒造社製)を用いて連結させた。この反応液で、E.coli JM109株のコンピテントセル(宝酒造社製)を形質転換し、20mg/Lのストレプトマイシンおよび15mg/Lのテトラサイクリンを含むLB寒天培地に塗布し、37℃で一晩培養した。寒天培地上に出現したコロニーを、20mg/Lのストレプトマイシンおよび15mg/Lのテトラサイクリンを含むLB液体培地に接種し、37℃で8時間振とう培養した。この培養液から、アルカリ-SDS法にてプラスミドDNAを抽出し、制限酵素で消化して、そのプラスミドの構造を確認し、pRSlysE-Tcを取得した。

【0082】

(2) メチロバチラス属細菌へのpRSlysE-Tcの導入

上記のようにして得られたpRSlysE-Tcを、エレクトロポレーション法 (Canadian Journal of Microbiology, 43. 197 (1997)) によりメチロバチラス・グリコゲネスNCIMB11375株に導入した。なお、対照として、pRK310をpRSlysE-Tcと同様にしてNCIMB11375株に導入した。その結果、対照として用いたpRK310では1 μ gのDNAあたり数千個のコロニーを得たが、それに対してpRSlysE-Tcでは数個のコロニーしか得られなかった。このことから、メチロフィラス属細菌と同様に、メチロバチラス属細菌においてもコリネバクテリウム属細菌由来のlysE遺伝子は機能しないことがわかった。

【0083】

(3) pRSlysE24-Tcの構築

次に、メチロバチラス属細菌においてlysE24が機能するかどうかを確かめるために、実施例1にて構築したpRSlysE24プラスミドの薬剤耐性マーカーを、ストレプトマイシン耐性遺伝子からテトラサイクリン耐性遺伝子へと変更することにした。

具体的には、まずpRSlysE24を制限酵素EcoRIで消化し、フェノール・クロロホルム混合溶液を加えて混合し、消化反応を停止させた。反応液を遠心分離した後、上層の溶液を回収し、エタノール沈殿法にてDNA断片を回収した。これを0.8%アガロースゲル電気泳動にて分離し、約10 kbpのDNA断片をEASY TRAP ver.2 (DNA回収キット、宝酒造社製)を用いて回収した。

【0084】

一方、テトラサイクリン耐性遺伝子断片は、前記と同様にして、配列番号11及び12のプライマーを用いたPCRによりpRK310から同遺伝子領域を増幅し、EcoRIで消化することによって取得した。

【0085】

上記のように調製したpRSlysE24に由来するDNA断片と、テトラサイクリン耐性遺伝子領域を含むDNA断片を、DNA Ligation kit ver.2(宝酒造社製)を用いて連結させた。この反応液で、E.coli JM109株のコンピテントセル(宝酒造社製)を形

質転換し、20mg/Lのストレプトマイシンおよび15mg/Lのテトラサイクリンを含むLB寒天培地に塗布し37℃で一晩培養した。寒天培地上に出現したコロニーを、20mg/Lのストレプトマイシンおよび15mg/Lのテトラサイクリンを含むLB液体培地に接種し、37℃で8時間振とう培養した。この培養液から、アルカリ-SDS法にてプラスミドDNAを抽出し、制限酵素で消化して、そのプラスミドの構造を確認し、pRSlysE24-Tcを取得した。

【0086】

(4) メチロバチラス属細菌へのpRSlysE24-Tcの導入

上記のようにして得られたpRSlysE24-Tcを、エレクトロポレーション法 (Canadian Journal of Microbiology, 43. 197 (1997)) によりメチロバチラス・グリコゲネスNCIMB11375株に導入した。なお、対照として、pRK310をNCIMB11375株に導入した。その結果、対照として用いたpRK310とほぼ同頻度でpRSlysE24-Tcが導入できた。プラスミド導入株について<1>(2)と同様の方法で培養上清中のL-リジン濃度を測定した結果を、表2に示す。

【表2】

表2

菌 株	L-リジンの生産量 (g/L)	L-アルギニンの生産量 (g/L)
NCIMB 11375 /pRK310	<0.01	<0.01
NCIMB 11375 /pRSlysE24-Tc	1.57	0.16

【0087】

lysE24遺伝子をメチロバチラス・グリコゲネスNCIMB11375株に導入することによって、培地中にL-リジンが蓄積することがわかった。これは、L-リジンの排出が促進されたことによると考えられた。また、培養上清中の他のL-アミノ酸の濃度も調べたところ、NCIMB11375/pRSlysE24-Tc株では、L-アルギニンが蓄積しており、lysE24はL-リジンだけでなく、L-アルギニン排出活性も持つ

ていることがわかった。

【0088】

以上の検討から、メチロフィラス属細菌で機能するlysE24は、メチロバチラス属細菌でも機能することがわかった。

【0089】

【実施例3】メチロバチラス・グリコゲネスへのL-リジン生合成系酵素遺伝子及びlysE24遺伝子の導入

lysE24遺伝子をメチロバチラス・グリコゲネスNCIMB11375株に導入することによって、培地中にL-リジンが蓄積することがわかった。これは、L-リジンの排出が促進されたことによると考えられた。

【0090】

そこで、L-リジン生合成遺伝子が増強されたメチロバチラス・グリコゲネスにおけるlysE24遺伝子導入の効果を調べた。

【0091】

<1>dapA*遺伝子を持つプラスミドpRSdapAの構築

L-リジン生合成系酵素遺伝子として、L-リジンによるフィードバック阻害を受けないジヒドロジピコリン酸合成酵素をコードする遺伝子(dapA*)を持つプラスミドを作製した。

【0092】

実施例1で作製したpRStacをSse8387IおよびXbaIで消化し、フェノール・クロロホルム溶液を加えて混合し、反応を停止させた。反応液を遠心分離した後、上層を回収し、エタノール沈殿にてDNAを回収後、0.8%アガロースゲルで分離し、約8kbpのDNA断片を回収した。

【0093】

dapA*遺伝子断片は、同遺伝子を含む公知のプラスミドRSFD80(W090/16042号参照)を鋳型として、配列番号3および4に示すプライマーを用いたPCR法(変性94℃-20秒、アニーリング55℃-30秒、伸長反応72℃-60秒)により増幅した。PCR反応には、Pyrobest DNA polymerase(宝酒造社製)を使用した。得られたdapA*断片をPCRprep(Promega社製)にて精製した後、制限酵素Sse8387IおよびXbaIで消

化した。フェノール・クロロホルム溶液を加えて混合し、反応を停止させた。反応液を遠心分離した後、上層を回収し、エタノール沈殿にてDNAを回収し、0.8%アガロースゲルで分離後、約0.1kbpのDNA断片を回収した。

【0094】

上記のように調製したpRStacベクター消化物と、dapA*遺伝子領域断片を、DNA Ligation Kit Ver.2 (宝酒造製) を用いて連結させた。この連結反応溶液でエシェリヒア・コリ (E.coli JM109 competent cells、宝酒造社) を形質転換し、20mg/Lのストレプトマイシンを含むLB寒天培地に塗布し、37℃で一晩保温した。寒天培地上に出現したコロニーを、20mg/Lのストレプトマイシンを含むLB液体培地に接種し、37℃で8時間振盪培養した。アルカリー-SDS法にて各培養液からプラスミドDNAを抽出し、制限酵素での消化および塩基配列の決定により構造を確認して、pRSdapAプラスミドを得た。pRSdapAプラスミドは、tacプロモーターの転写方向に対して、dapA*遺伝子の転写方向が同じ向きになるように配置されている。

【0095】

pRSdapAプラスミドで形質転換されたE.coli JM109株はAJ13831と命名され、同株は2001年6月4日に、独立行政法人 産業技術総合研究所 特許生物寄託センターに受託番号FERM P-18370として寄託され、平成14年5月13日にブダペスト条約に基づく国際寄託に移管され、FERM BP-8041の受託番号のもとで寄託されている。

【0096】

<2>lysE24及びdapA*を持つプラスミドpRSlysE24-dapA-Tcの構築

lysE24とdapA*の組み合わせ効果を評価するために、pRSlysE24プラスミドにdapA*遺伝子を挿入したプラスミドを、図2に示した方法で構築した。

実施例1で作製したpRSlysE24を制限酵素SapIで消化し、DNA Blunting Kit (宝酒造社製) にて末端を平滑化した。また、dapA*を持つプラスミドpRSdapAを制限酵素EcoRIおよびSapIで消化し、0.8%アガロースゲルにより約1kbpのtacプロモーターおよびdapA*領域を含む断片を分離し、同断片をEASY TRAP Ver2 (宝酒造製) にて回収した。この断片を前記と同様に平滑化し、前記のpRSlysE24の消化

物とDNA Ligation Kit Ver2(宝酒造製)にて連結した。

【0097】

上記の連結反応溶液でエシェリヒア・コリ (E.coli JM109 competent cells、宝酒造社製) を形質転換し、20mg/Lのストレプトマイシンを含むLB寒天培地に塗布し、37℃で一晩保温した。寒天培地上に出現したコロニーを20mg/Lのストレプトマイシンを含むLB液体培地に接種し、37℃で8時間振盪培養した。アルカリ-SDS法にて各培養液からプラスミドDNAを抽出し、制限酵素での消化および塩基配列の決定により構造を確認して、pRSlysEdapAプラスミドを得た。

pRSlysEdapAプラスミドで形質転換されたE.coli JM109株はAJ13832と命名され、同株は2001年6月4日に、独立行政法人 産業技術総合研究所 特許生物寄託センターに受託番号FERM P-18371として寄託され、平成14年5月13日にブダペスト条約に基づく国際寄託に移管され、FERM BP-8042の受託番号のもとで寄託されている。

【0098】

次に、pRSlysEdapAプラスミドの薬剤耐性マーカー遺伝子を、ストレプトマイシン耐性遺伝子からテトラサイクリン耐性遺伝子へと変更した。まず、pRSlysEdapAプラスミドをEcoRIで消化し、フェノール・クロロフォルム混合溶液を加えて混合し、消化反応を停止させた。反応液を遠心分離した後、上層の溶液を回収し、エタノール沈殿法にてDNA断片を回収した。これを0.8%アガロースゲル電気泳動にて分離し、約1.1kbpのDNA断片をEASY TRAP ver.2 (DNA回収キット、宝酒造社製)を用いて回収した。

【0099】

一方、テトラサイクリン耐性遺伝子断片は、実施例1と同様にして、配列番号11及び12のプライマーを用いたPCRによりpRK310から同遺伝子領域を増幅し、EcoRIで消化することによって取得した。

【0100】

上記のように調製したpRSlysEdapAに由来するDNA断片と、テトラサイクリン耐性遺伝子領域を含むDNA断片を、DNA Ligation kit ver.2(宝酒造社製)を用いて連結させた。この反応液で、E.coli JM109株のコンピテントセル(宝酒造社製)を

形質転換し、20mg/Lのストレプトマイシンおよび15mg/Lのテトラサイクリンを含むLB寒天培地に塗布し37℃で一晩培養した。寒天培地上に出現したコロニーを、20mg/Lのストレプトマイシンおよび15mg/Lのテトラサイクリンを含むLB液体培地に接種し、37℃で16時間振とう培養した。この培養液から、アルカリ-SDS法にてプラスミドDNAを抽出し、制限酵素で消化して、そのプラスミドの構造を確認し、pRSlysE-dapA-Tcを取得した。

【0101】

(2) メチロバチラス・グリコゲネスNCIMB111375株へのpRSlysE-dapA-Tcの導入とアミノ酸の製造

上記の方法で得られたpRSlysE-dapA-Tcプラスミドを、エレクトロポレーション法によりメチロバチラス・グリコゲネスNCIMB111375株に導入した。得られた形質転換株（以下、「NCIMB111375/pRSlysE-dapA-Tc」ともいう）、前記のpRSlysE24-Tcが導入された株（以下、「NCIMB111375/pRSlysE-Tc」ともいう）、および対照としてpRK310を導入した株（以下、「NCIMB111375/pRK310」ともいう）について、以下のように培養し、培養液上清中のL-アミノ酸濃度を調べた。

【0102】

各形質転換株を、15mg/Lのテトラサイクリンを含むSEIIプレートに塗り広げ、30℃にて2晩培養したのち、培地表面約10cm²の菌体をかきとって15mg/Lのテトラサイクリンを含むSEII生産培地(20ml)に植菌し、30℃にて60時間振盪培養した。培養終了後、菌体を遠心分離により除去し、培養上清に含まれるL-リジン濃度をアミノ酸分析計（日本分光製、高速液体クロマトグラフィー）で定量した。結果を表3に示す。NCIMB/pRSlysE-dapA-Tc株では、pRSlysE24-Tcを導入した株と比較して、培地中のL-リジン蓄積量はさらに向上する事がわかった。つまり、lysE24遺伝子の導入により、排出における律速が解除され、dapA*遺伝子増強効果が相乗的に表れたと考えられる。

【0103】

【表3】

表3

菌 株	L - リジンの生産量 (g/L)	L - アルギニンの生産量 (g/L)
NCIMB11375/pRK310	<0.02	<0.01
NCIMB11375/pRSlysE24-Tc	1.57	0.16
NCIMB11375/pRSlysE-dapA-Tc	1.72	0.14

【 0 1 0 4 】

【発明の効果】

本発明により、メタノール資化性菌の L - アミノ酸生産性、特に L - リジン及び L - アルギニンの生産性を向上させることができる。

【 0 1 0 5 】

【配列表】

SEQUENCE LISTING

<110> Ajinomoto Co. Inc.

<120> メタノール資化性菌を用いた L - リジンまたは L - アルギニンの製造法

<130> P-B0246

<140>

<141> 2002-11-20

<160> 14

<170> PatentIn Ver. 2.0

<210> 1

<211> 39

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: primer

<400> 1

agggaattcc ccgttctgga taatgttttt tgcgccgac

39

<210> 2

<211> 58

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: primer

<400> 2

cggatgcattc tagagttaac ctgcagggtg aaattgttat ccgctcaca ttccacac 58

<210> 3

<211> 35

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: primer

<400> 3

tgacctgcag gtttgcacag aggatggccc atgtt

35

<210> 4

<211> 36

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: primer

<400> 4

cattctagat ccctaaactt tacagcaaac cggcat

36

<210> 5

<211> 64

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: primer

<400> 5

catttcctgc aggcaaagga gatgagcgta atggtgatca tggaaatctt cattacaggt 60

ctgc

64

<210> 6

<211> 50

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: primer

<400> 6

gggcgagcta gaagagctcc aaaacccgcg aaaactaacc catcaacatc 50

<210> 7

<211> 711

<212> DNA

<213> Brevibacterium lactofermentum

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(711)

<400> 7

atg gtg atc atg gaa atc ttc att aca ggt ctg ctt ttg ggg gcc agt 48

Met Val Ile Met Glu Ile Phe Ile Thr Gly Leu Leu Leu Gly Ala Ser

1 5 10 15

ctt tta ctg tcc atc gga ccg cag aat gta ctg gtg att aaa caa gga 96

Leu Leu Leu Ser Ile Gly Pro Gln Asn Val Leu Val Ile Lys Gln Gly

20 25 30

att aag cgc gaa gga ctc att gcg gtt ctt ctc gtg tgt tta att tct 144

Ile Lys Arg Glu Gly Leu Ile Ala Val Leu Leu Val Cys Leu Ile Ser

35 40 45

gac gtc ttt ttg ttc atc gcc ggc acc ttg ggc gtt gat ctt ttg tcc 192

Asp Val Phe Leu Phe Ile Ala Gly Thr Leu Gly Val Asp Leu Leu Ser

50 55 60

aat gcc gcg ccg atc gtg ctc gat att atg cgc tgg ggt ggc atc gct 240
 Asn Ala Ala Pro Ile Val Leu Asp Ile Met Arg Trp Gly Gly Ile Ala
 65 70 75 80
 tac ctg tta tgg ttt gcc gtc atg gca gcg aaa gac gcc atg aca aac 288
 Tyr Leu Leu Trp Phe Ala Val Met Ala Ala Lys Asp Ala Met Thr Asn
 85 90 95
 aag gtg gaa gcg cca cag atc att gaa gaa aca gaa cca acc gtg ccc 336
 Lys Val Glu Ala Pro Gln Ile Ile Glu Glu Thr Glu Pro Thr Val Pro
 100 105 110
 gat gac acg cct ttg ggc ggt tgc gcg gtg gcc act gac acg cgc aac 384
 Asp Asp Thr Pro Leu Gly Gly Ser Ala Val Ala Thr Asp Thr Arg Asn
 115 120 125
 cgg gtg cgg gtg gag gtg agc gtc gat aag cag cgg gtt tgg gta aag 432
 Arg Val Arg Val Glu Val Ser Val Asp Lys Gln Arg Val Trp Val Lys
 130 135 140
 ccc atg ttg atg gca atc gtg ctg acc tgg ttg aac ccg aat gcg tat 480
 Pro Met Leu Met Ala Ile Val Leu Thr Trp Leu Asn Pro Asn Ala Tyr
 145 150 155 160
 ttg gac gcg ttt gtg ttt atc ggc ggc gtc ggc gcg caa tac ggc gac 528
 Leu Asp Ala Phe Val Phe Ile Gly Gly Val Gly Ala Gln Tyr Gly Asp
 165 170 175
 acc gga cgg tgg att ttc gcc gct ggc gcg ttc gcg gca agc ctg atc 576
 Thr Gly Arg Trp Ile Phe Ala Ala Gly Ala Phe Ala Ala Ser Leu Ile
 180 185 190
 tgg ttc ccg ctg gtg ggt ttc ggc gca gca gca ttg tca cgc ccg ctg 624
 Trp Phe Pro Leu Val Gly Phe Gly Ala Ala Ala Leu Ser Arg Pro Leu
 195 200 205
 tcc agc ccc aag gtg tgg cgc tgg atc aac gtc gtc gtg gca gtt gtg 672
 Ser Ser Pro Lys Val Trp Arg Trp Ile Asn Val Val Val Ala Val Val

210 215 220
 atg acc gca ttg gcc atc aaa ctg atg ttg atg ggt tag 711
 Met Thr Ala Leu Ala Ile Lys Leu Met Leu Met Gly

225 230 235

<210> 8

<211> 236

<212> PRT

<213> Brevibacterium lactofermentum

<400> 8

Met Val Ile Met Glu Ile Phe Ile Thr Gly Leu Leu Leu Gly Ala Ser
 1 5 10 15

Leu Leu Leu Ser Ile Gly Pro Gln Asn Val Leu Val Ile Lys Gln Gly
 20 25 30

Ile Lys Arg Glu Gly Leu Ile Ala Val Leu Leu Val Cys Leu Ile Ser
 35 40 45

Asp Val Phe Leu Phe Ile Ala Gly Thr Leu Gly Val Asp Leu Leu Ser
 50 55 60

Asn Ala Ala Pro Ile Val Leu Asp Ile Met Arg Trp Gly Gly Ile Ala
 65 70 75 80

Tyr Leu Leu Trp Phe Ala Val Met Ala Ala Lys Asp Ala Met Thr Asn
 85 90 95

Lys Val Glu Ala Pro Gln Ile Ile Glu Glu Thr Glu Pro Thr Val Pro
 100 105 110

Asp Asp Thr Pro Leu Gly Gly Ser Ala Val Ala Thr Asp Thr Arg Asn
 115 120 125

Arg Val Arg Val Glu Val Ser Val Asp Lys Gln Arg Val Trp Val Lys
 130 135 140

Pro Met Leu Met Ala Ile Val Leu Thr Trp Leu Asn Pro Asn Ala Tyr
 145 150 155 160
 Leu Asp Ala Phe Val Phe Ile Gly Gly Val Gly Ala Gln Tyr Gly Asp
 165 170 175
 Thr Gly Arg Trp Ile Phe Ala Ala Gly Ala Phe Ala Ala Ser Leu Ile
 180 185 190
 Trp Phe Pro Leu Val Gly Phe Gly Ala Ala Ala Leu Ser Arg Pro Leu
 195 200 205
 Ser Ser Pro Lys Val Trp Arg Trp Ile Asn Val Val Val Ala Val Val
 210 215 220
 Met Thr Ala Leu Ala Ile Lys Leu Met Leu Met Gly
 225 230 235

<210> 9

<211> 712

<212> DNA

<213> Brevibacterium lactofermentum

<220>

<221> CDS

<222> (1).. (375)

<400> 9

atg gtg atc atg gaa atc ttc att aca ggt ctg ctt ttg ggg gcc agt 48
 Met Val Ile Met Glu Ile Phe Ile Thr Gly Leu Leu Leu Gly Ala Ser
 1 5 10 15
 ctt ttg ctg tcc atc gga ccg cag aat gta ctg gtg att aaa caa gga 96
 Leu Leu Leu Ser Ile Gly Pro Gln Asn Val Leu Val Ile Lys Gln Gly
 20 25 30

att aag cgc gaa gga ctc att gcg gtt ctt ctc gtg tgt tta att tct 144
 Ile Lys Arg Glu Gly Leu Ile Ala Val Leu Leu Val Cys Leu Ile Ser
 35 40 45
 gac gtc ttt ttg ttc atc gcc ggc acc ttg ggc gtt gat ctt ttg tcc 192
 Asp Val Phe Leu Phe Ile Ala Gly Thr Leu Gly Val Asp Leu Leu Ser
 50 55 60
 aat gcc gcg ccg atc gtg ctc gat att atg cgc tgg ggt ggc atc gct 240
 Asn Ala Ala Pro Ile Val Leu Asp Ile Met Arg Trp Gly Gly Ile Ala
 65 70 75 80
 tac ctg tta tgg ttt gcc gtc atg gca gcg aaa gac gcc atg aca aac 288
 Tyr Leu Leu Trp Phe Ala Val Met Ala Ala Lys Asp Ala Met Thr Asn
 85 90 95
 aag gtg gaa gcg cca cag atc att gaa gaa aca gaa cca acc gtg ccc 336
 Lys Val Glu Ala Pro Gln Ile Ile Glu Glu Thr Glu Pro Thr Val Pro
 100 105 110
 gat gac acg cct ttg ggc gtg ttc ggc ggt ggc cac tga cagcgcgaac 385
 Asp Asp Thr Pro Leu Gly Val Phe Gly Gly Gly His
 115 120 125
 cgggtgcggg tggaggtgag cgtcgataag cagcgggttt ggggtgaagcc catgttgatg 445
 gcaatcgtgc tgacctggtt gaaccggaat gcgtatttgg acgcgtttgt gtttatcggc 505
 ggcgctcggcg cgcaatacgg cgacaccgga cggtggattt tcgccgctgg cgcgttcgcg 565
 gcaagcctga tctggttccc gctggtgggt ttcggcgcag cagcattgtc acgcccgtg 625
 tccagcccca aggtgtggcg ctggatcaac gtcgtcgtgg cagttgtgat gaccgcattg 685
 gccatcaaac tgatgttgat gggttag 712

<210> 10

<211> 124

<212> PRT

<213> Brevibacterium lactofermentum

<400> 10

Met Val Ile Met Glu Ile Phe Ile Thr Gly Leu Leu Leu Gly Ala Ser

1

5

10

15

Leu Leu Leu Ser Ile Gly Pro Gln Asn Val Leu Val Ile Lys Gln Gly

20

25

30

Ile Lys Arg Glu Gly Leu Ile Ala Val Leu Leu Val Cys Leu Ile Ser

35

40

45

Asp Val Phe Leu Phe Ile Ala Gly Thr Leu Gly Val Asp Leu Leu Ser

50

55

60

Asn Ala Ala Pro Ile Val Leu Asp Ile Met Arg Trp Gly Gly Ile Ala

65

70

75

80

Tyr Leu Leu Trp Phe Ala Val Met Ala Ala Lys Asp Ala Met Thr Asn

85

90

95

Lys Val Glu Ala Pro Gln Ile Ile Glu Glu Thr Glu Pro Thr Val Pro

100

105

110

Asp Asp Thr Pro Leu Gly Val Phe Gly Gly Gly His

115

120

<210> 11

<211> 39

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: primer

<400> 11

aaagaattcg cacggtacac tgtattcggc tgcaacttt

39

<210> 12

<211> 41

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: primer

<400> 12

aaagaattcg ccgtgttgct aggatggttg ttcttggatc a

41

<210> 13

<211> 1197

<212> DNA

<213> Escherichia coli

<220>

<221> CDS

<222> (272)..(1153)

<400> 13

ccaggcgact gtcttcaata ttacagccgc aactactgac atgacgggtg atggtgttca 60
caattccacg gcgatcggca cccaacgcag tgatcaccag ataatgtgtt gcgatgacag 120
tgtcaaactg gttattcctt taagggtgga gttgttctta aggaaagcat aaaaaaaca 180
tgcatacaac aatcagaacg gttctgtctg cttgctttta atgccatacc aaacgtacca 240
ttgagacact tgtttgaca gaggatggcc c atg ttc acg gga agt att gtc 292

Met Phe Thr Gly Ser Ile Val

1

5

gcg att gtt act ccg atg gat gaa aaa ggt aat gtc tgt cgg gct agc 340
 Ala Ile Val Thr Pro Met Asp Glu Lys Gly Asn Val Cys Arg Ala Ser
 10 15 20
 ttg aaa aaa ctg att gat tat cat gtc gcc agc ggt act tcg gcg atc 388
 Leu Lys Lys Leu Ile Asp Tyr His Val Ala Ser Gly Thr Ser Ala Ile
 25 30 35
 gtt tct gtt ggc acc act ggc gag tcc gct acc tta aat cat gac gaa 436
 Val Ser Val Gly Thr Thr Gly Glu Ser Ala Thr Leu Asn His Asp Glu
 40 45 50 55
 cat gct gat gtg gtg atg atg acg ctg gat ctg gct gat ggg cgc att 484
 His Ala Asp Val Val Met Met Thr Leu Asp Leu Ala Asp Gly Arg Ile
 60 65 70
 ccg gta att gcc ggg acc ggc gct aac gct act gcg gaa gcc att agc 532
 Pro Val Ile Ala Gly Thr Gly Ala Asn Ala Thr Ala Glu Ala Ile Ser
 75 80 85
 ctg acg cag cgc ttc aat gac agt ggt atc gtc ggc tgc ctg acg gta 580
 Leu Thr Gln Arg Phe Asn Asp Ser Gly Ile Val Gly Cys Leu Thr Val
 90 95 100
 acc cct tac tac aat cgt ccg tcg caa gaa ggt ttg tat cag cat ttc 628
 Thr Pro Tyr Tyr Asn Arg Pro Ser Gln Glu Gly Leu Tyr Gln His Phe
 105 110 115
 aaa gcc atc gct gag cat act gac ctg ccg caa att ctg tat aat gtg 676
 Lys Ala Ile Ala Glu His Thr Asp Leu Pro Gln Ile Leu Tyr Asn Val
 120 125 130 135
 ccg tcc cgt act ggc tgc gat ctg ctc ccg gaa acg gtg ggc cgt ctg 724
 Pro Ser Arg Thr Gly Cys Asp Leu Leu Pro Glu Thr Val Gly Arg Leu
 140 145 150
 gcg aaa gta aaa aat att atc gga atc aaa gag gca aca ggg aac tta 772
 Ala Lys Val Lys Asn Ile Ile Gly Ile Lys Glu Ala Thr Gly Asn Leu

155	160	165	
acg cgt gta aac cag atc aaa gag ctg gtt tca gat gat ttt gtt ctg			820
Thr Arg Val Asn Gln Ile Lys Glu Leu Val Ser Asp Asp Phe Val Leu			
170	175	180	
ctg agc ggc gat gat gcg agc gcg ctg gac ttc atg caa ttg ggc ggt			868
Leu Ser Gly Asp Asp Ala Ser Ala Leu Asp Phe Met Gln Leu Gly Gly			
185	190	195	
cat ggg gtt att tcc gtt acg act aac gtc gca gcg cgt gat atg gcc			916
His Gly Val Ile Ser Val Thr Thr Asn Val Ala Ala Arg Asp Met Ala			
200	205	210	215
cag atg tgc aaa ctg gca gca gaa gaa cat ttt gcc gag gca cgc gtt			964
Gln Met Cys Lys Leu Ala Ala Glu Glu His Phe Ala Glu Ala Arg Val			
220	225	230	
att aat cag cgt ctg atg cca tta cac aac aaa cta ttt gtc gaa ccc			1012
Ile Asn Gln Arg Leu Met Pro Leu His Asn Lys Leu Phe Val Glu Pro			
235	240	245	
aat cca atc ccg gtg aaa tgg gca tgt aag gaa ctg ggt ctt gtg gcg			1060
Asn Pro Ile Pro Val Lys Trp Ala Cys Lys Glu Leu Gly Leu Val Ala			
250	255	260	
acc gat acg ctg cgc ctg cca atg aca cca atc acc gac agt ggt cgt			1108
Thr Asp Thr Leu Arg Leu Pro Met Thr Pro Ile Thr Asp Ser Gly Arg			
265	270	275	
gag acg gtc aga gcg gcg ctt aag cat gcc ggt ttg ctg taa agt			1153
Glu Thr Val Arg Ala Ala Leu Lys His Ala Gly Leu Leu Ser			
280	285	290	
ttagggagat ttgatggctt actctgttca aaagtcgcgc ctgg			1197

<210> 14

<211> 292

<212> PRT

<213> Escherichia coli

<400> 14

Met Phe Thr Gly Ser Ile Val Ala Ile Val Thr Pro Met Asp Glu Lys

1 5 10 15

Gly Asn Val Cys Arg Ala Ser Leu Lys Lys Leu Ile Asp Tyr His Val

20 25 30

Ala Ser Gly Thr Ser Ala Ile Val Ser Val Gly Thr Thr Gly Glu Ser

35 40 45

Ala Thr Leu Asn His Asp Glu His Ala Asp Val Val Met Met Thr Leu

50 55 60

Asp Leu Ala Asp Gly Arg Ile Pro Val Ile Ala Gly Thr Gly Ala Asn

65 70 75 80

Ala Thr Ala Glu Ala Ile Ser Leu Thr Gln Arg Phe Asn Asp Ser Gly

85 90 95

Ile Val Gly Cys Leu Thr Val Thr Pro Tyr Tyr Asn Arg Pro Ser Gln

100 105 110

Glu Gly Leu Tyr Gln His Phe Lys Ala Ile Ala Glu His Thr Asp Leu

115 120 125

Pro Gln Ile Leu Tyr Asn Val Pro Ser Arg Thr Gly Cys Asp Leu Leu

130 135 140

Pro Glu Thr Val Gly Arg Leu Ala Lys Val Lys Asn Ile Ile Gly Ile

145 150 155 160

Lys Glu Ala Thr Gly Asn Leu Thr Arg Val Asn Gln Ile Lys Glu Leu

165 170 175

Val Ser Asp Asp Phe Val Leu Leu Ser Gly Asp Asp Ala Ser Ala Leu

180 185 190

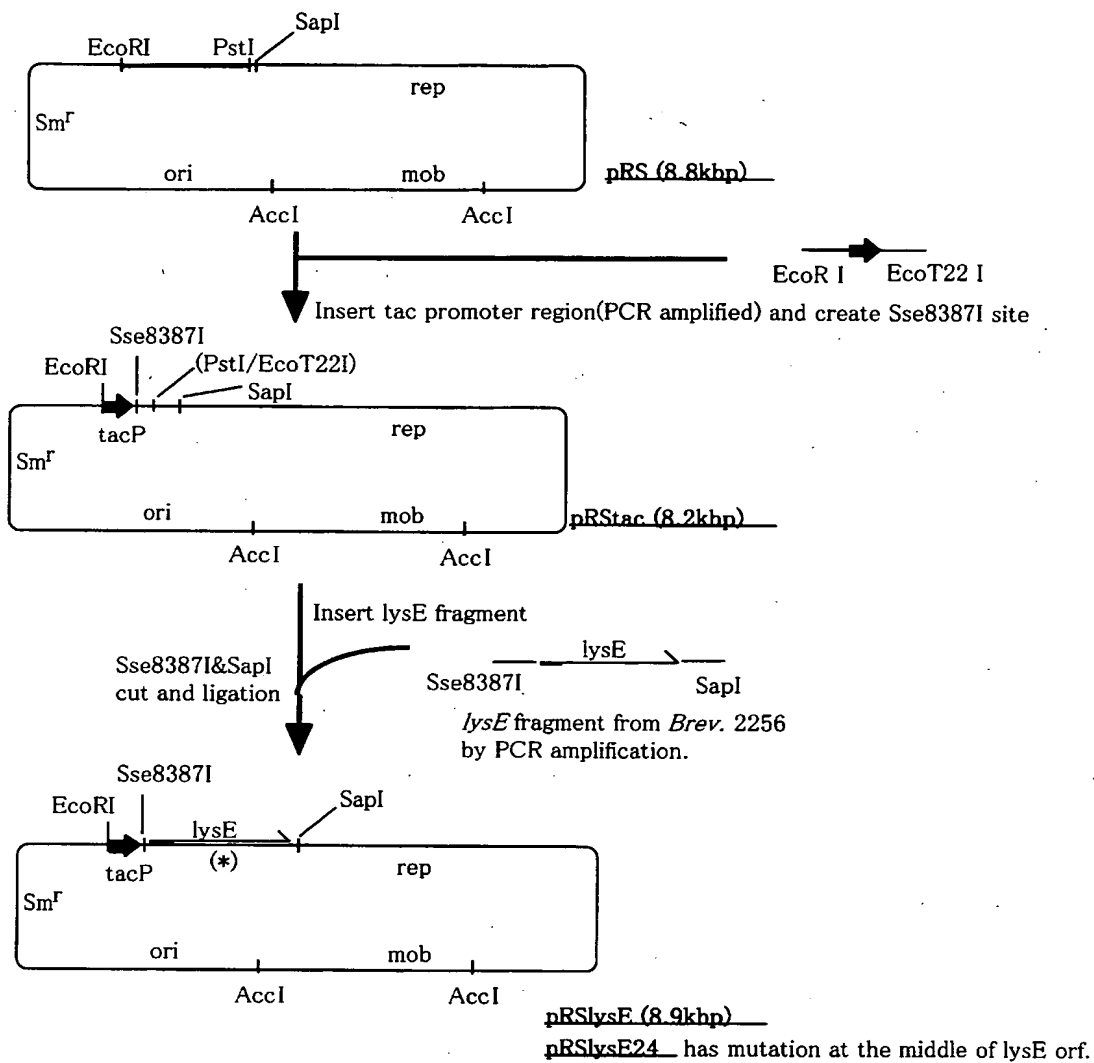
Asp Phe Met Gln Leu Gly Gly His Gly Val Ile Ser Val Thr Thr Asn

【図面の簡単な説明】

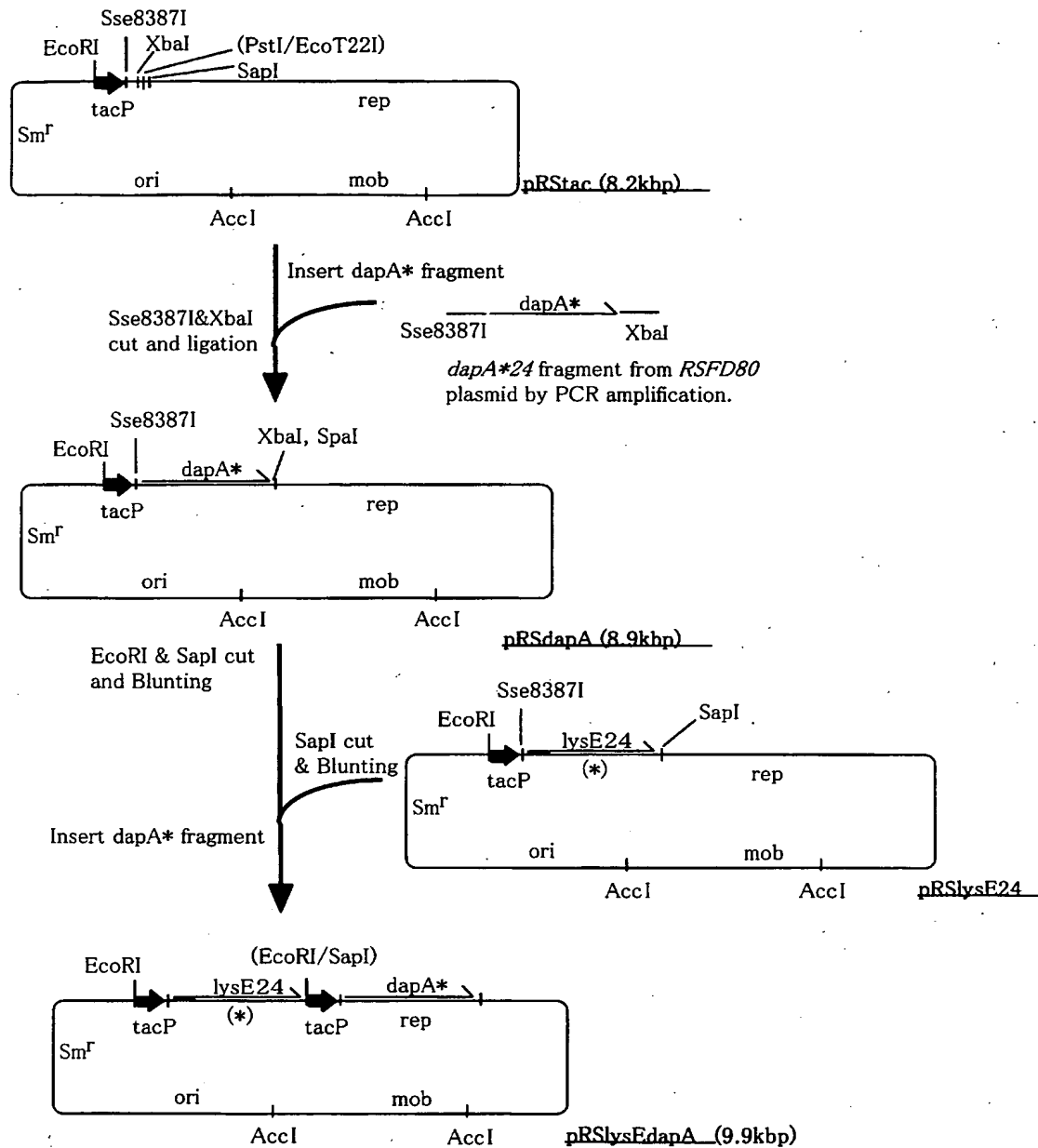
【図2】 lysE24遺伝子とdapA*遺伝子を持つプラスミドpRSlysEdapAの構築を示す図。

【書類名】 図面

【図 1】



【図 2】



【書類名】 要約書

【要約】

【課題】 メタノール資化性菌のL-アミノ酸生産性、特にL-リジンまたはL-アルギニンの生産性を向上させる。

【解決手段】 メチロバチラス属細菌で、L-リジンの排出能が発揮できるL-リジン排出系を導入する事によるループ領域と、6個の疎水性ヘリックスとを有し、かつ、L-リジンの細胞外への排出に関与するタンパク質の改変体をコードするDNAであって、

野生型タンパク質が持つループ領域を持たない変異型タンパク質をコードし、かつ、メタノール資化性菌に導入したときにL-リジンもしくはL-アルギニン又はこれらの両方のL-アミノ酸の細胞外への排出を促進するDNA、具体的にはlysE24をメチロバチラス属細菌などのメタノール資化生菌に導入する。

【選択図】 図2

特願 2002-336340

出願人履歴情報

識別番号

[000000066]

1. 変更年月日 1991年 7月 2日
[変更理由] 住所変更
住 所 東京都中央区京橋1丁目15番1号
氏 名 味の素株式会社
2. 変更年月日 2003年 5月12日
[変更理由] 名称変更
住所変更
住 所 東京都中央区京橋1丁目15番1号
氏 名 味の素株式会社